



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 40 970 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 196 40 970.5
⑳ Anmeldetag: 4. 10. 96
㉑ Offenlegungstag: 16. 4. 98

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 K 5/06
C 07 K 5/08
C 07 K 5/10
A 61 K 38/05
A 61 K 38/06
A 61 K 38/07
A 61 K 31/44
A 61 K 31/47
A 61 K 31/505
A 61 K 31/35
C 07 D 487/04
C 07 D 401/04

DE 196 40 970 A 1

// (C07D 487/04, 239:00,209:00)(C07D 401/04,215:56,209:44) (C07D 491/22,221:00, 209:00,311:00)

⑦① Anmelder:
Bayer AG, 51373 Leverkusen, DE

⑦② Erfinder:
Lerchen, Hans-Georg, Dr., 51375 Leverkusen, DE;
Bruch, Karsten von dem, Dr., 51375 Leverkusen, DE;
Baumgarten, Jörg, Dr., 42115 Wuppertal, DE;
Sperzel, Michael, Dr., 42275 Wuppertal, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Modifizierte Cytostatika

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate aus Cytostatika und N-Thiocarbonyl-modifizierten Aminosäuren bzw. Peptiden, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.

DE 196 40 970 A 1

DE 196 40 970 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate aus Cytostatika und N-Thiocarbonylmodifizierten Aminosäuren bzw. Peptiden, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit

5 Krebserkrankungen.

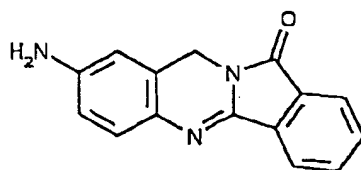
Die Chemotherapie bei Tumorerkrankungen ist begleitet von meist schwerwiegenden Nebenwirkungen, bedingt durch die Toxizität von Chemotherapeutika auf proliferierende Zellen anderer Gewebe. Seit vielen Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit dem Problem der Verbesserung der Selektivität von eingesetzten Wirkstoffen. Ein vielfach verfolgter Ansatz ist die Synthese von Prodrugs, die mehr oder weniger selektiv im Zielgewebe beispielsweise durch Veränderung des pH-Wertes (z. B. Tietze et al., DE 42 29 903), durch Enzyme (z. B. Glucuronidasen; Jacquesy et al., EP 511 917; Bosslet et al., EP 595 133) oder durch Antikörper-Enzym-Konjugate (Bagshawe et al., WO 88/07378; Senter et al., US PS 4 975 278; Bosslet et al., EP 595 133) freigesetzt werden. Problematisch bei diesen Ansätzen ist u. a. die mangelnde Stabilität der Konjugate in anderen Geweben und Organen und insbesondere die ubiquitäre Wirkstoffverteilung, die sich an die extrazelluläre Wirkstofffreisetzung im Tumorgewebe anschließt.

15 Im folgenden werden beispielhaft drei cytostatisch aktive Grundkörper aus verschiedenen Substanzklassen, die mit schweren Nebenwirkungen behaftet sind, vorgestellt.

Das heterocyclische Amin Batracyclin (1) zeigt in verschiedenen Darmkrebs-Modellen eine gute Antitumorwirkung (US PS 4 757 072).

20

25



(1)

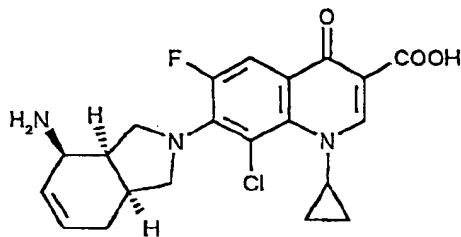
30 Peptidkonjugate von (1) mit guter In-vitro-Wirkung und günstigeren Löslichkeitseigenschaften (US 4 180 343) sind im Tierversuch schlechter verträglich als Batracyclin selbst. So reichern sich z. B. die in EP 501 250 beschriebenen Fucose-Konjugate sehr stark in der Leber an. Glycokonjugate von Cytostatika, wie sie in unserer ebenfalls anhängigen Anmeldung PCT/96/01279 beschrieben sind, weisen zwar günstigere Eigenschaften auf, sind aber synthetisch nur mit größerem Aufwand zugänglich.

35 Das Chinolon-a (2) 7-[(3aRS, 4RS, 7aSR)-4-Amino-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-isoindol-2-yl]-8-chlor-1-cyclopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-3-chinolincarbonsäure zeigt neben einer hervorragenden antibakteriellen Aktivität auch eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien (EP 520 240, JP 4 253 973). Dem stehen jedoch erhebliche toxikologische Probleme gegenüber (z. B. Genotoxizität, Knochenmarks-Toxizität, hohe akute Toxizität in vivo etc.).

40

45

50



(2) (Chinolon-a)

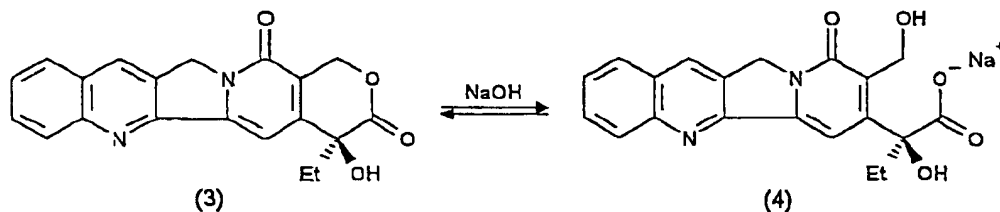
20(S)-Camptothecin (3) ist ein pentacyclisches Alkaloid, das 1966 von Wall et al. isoliert wurde (J. Amer. Chem. Soc. 88 (1966) 3888). Es besitzt ein hohes Antitumor-Wirkpotential in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Tests. Leider scheiterte jedoch die Realisierung des vielversprechenden Potentials in der Klinik an Toxizitäts- und Löslichkeitsproblemen.

Durch Öffnung des E-Ring-Lactons und Bildung des Natriumsalzes wurde eine wasserlösliche Verbindung erhalten, die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der ringgeschlossenen Form steht. Klinische Studien führten auch hier bisher nicht zum Erfolg.

60

65

DE 196 40 970 A 1



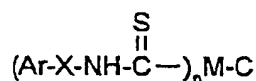
Etwa 20 Jahre später wurde gefunden, daß die biologische Aktivität auf eine Enzyminhibition der Topoisomerase I zurückzuführen ist. Seither wurden die Forschungsaktivitäten wieder verstärkt, um verträglichere und in vivo wirksame Camptothecin-Derivate zu finden.

Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden z. B. Salze von A-Ring- und B-Ring-modifizierten Camptothecin-Derivaten sowie von 20-O-Acyl-Derivaten mit ionisierbaren Gruppen beschrieben (Vishnuvajjala et al., US 4 943 579). Das letztere Prodrug-Konzept wurde später auch auf modifizierte Camptothecin-Derivate übertragen (Wani et al., WO 96/02546). Die beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs haben allerdings in vivo eine sehr kurze Halbwertszeit und werden sehr schnell zum Grundkörper gespalten.

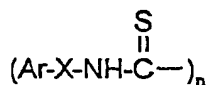
Wir fanden nun, daß die Modifizierung von Cytostatika wie z. B. Batracylin, antitumoraktive Chinolone (wie z. B. Chinolon-a) oder Camptothecin bzw. Camptothecin-Derivate mit N-thiocarbonyl-modifizierten Aminosäuren zu neuen Verbindungen mit überraschenden, hochinteressanten Eigenschaften führt:

- Die so erhaltenen Konjugate sind synthetisch gut zugänglich und zeigen in vitro eine ähnlich hohe Aktivität gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien und Tumorenografts wie das zugrundeliegende Toxophor.
- In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der N-thiocarbonyl-modifizierten Aminosäuren zeigen die erfindungsgemäßen Konjugate im Vergleich zu den zugrundeliegenden Cytostatika wesentlich verbesserte Löslicheitseigenschaften.
- Sie weisen gegenüber den zugrundeliegenden Toxophoren eine höhere Verträglichkeit und Tumorselektivität auf.
- In vivo zeigen sie eine gute bis sehr gute therapeutische Aktivität.
- Sie sind in extrazellulärem Medium und in Blut wesentlich stabiler als die zuvor beschriebenen reinen Aminosäure-Prodrugs von Batracylin, Chinolonen oder von Camptothecin-Derivaten.
- Im Fall von 20-O-Acylierungen von Camptothecin-Derivaten wird durch die esterartige Verknüpfung der Carrier-Reste mit der 20-Hydroxygruppe der für die Wirkung wichtige Lactonring stabilisiert.

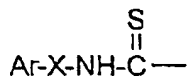
Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



worin



für 1 bis n' gleiche oder voneinander verschiedene Gruppierungen



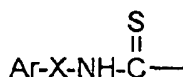
steht, wobei n eine Zahl 1 bis n' bedeutet und n' der maximalen Zahl möglicher Anknüpfungsstellen von M entspricht, worin

Ar für einen Arylrest mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen steht, der zusätzlich zu X gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert sein kann durch Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Alkoxycarbonyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Carboxy, Carboxyalkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Cyano, Nitro, Isocyanato, Isothiocyano, Halogen, Sulfonyl und/oder Sulfonamid,

X für eine direkte Einfachbindung oder für Alkylen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen steht,

M für ein Mono-, Di-, Tri- oder Tetrapeptid steht, das über die α -Aminogruppe und/oder über Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit den n gleichen oder voneinander verschiedenen Gruppierungen

DE 196 40 970 A 1



5 verknüpft ist, wobei weitere funktionelle Gruppen des Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können, C für einen Rest eines Cytostatikums oder eines Cytostatikum-Derivats steht, das über eine Aminofunktion oder über ein Sauerstoffatom mit M verknüpft ist, sowie deren Stereoisomere, Stereoisomergemische und Salze.

10 C kann eine interkalierende Substanz, ein Topoisomerase-Inhibitor, ein Antimetabolit, ein Alkylanz, ein Tubulinhemmer, ein Tyrosinphosphokinase-Inhibitor, ein Proteinkinase-C-Inhibitor oder ein Wirkstoff mit einem anderen oder unbekannten cytotostatischen oder cytotoxischen Wirkmechanismus sein. C kann beispielsweise ein Nucleosid, ein Endiin-Antibiotikum, eine Chinolon- oder Naphthyridoncarbonäure oder ein cytotoxisches Peptidantibiotikum z. B. aus der Klasse der Dolastatine sein. C kann Batracylin, Chinolon-a, 5-Fluoruracil, Cytosinarabinosid, Methotrexat, Etoposid, 15 Camptothecin, ein Camptothecin-Derivat, Daunomycin, Doxorubicin, Taxol, Vinblastin, Vincristin, Dynemicin, Calicheamycin, Esperamycin, Quercetin, Suramin, Erbstatin, Cyclophosphamid, Mitomycin C, Melphalan, Cisplatin, Bleomycin, Staurosporin oder ein anderer antineoplastisch aktiver Wirkstoff sein.

Der Begriff "Alkylgruppen" soll hierin sofern nicht anders angegeben geradkettige, verzweigte, cyclische und Cycloalkylreste enthaltende Alkylreste umfassen. Diese Definition soll sinngemäß auch für alle anderen Alkylgruppen enthaltenden Reste gelten, wie beispielsweise Alkoxy etc.

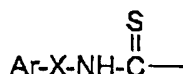
20 Bevorzugt sind Verbindungen der Formel (I), worin Ar für einen Phenylrest steht, der para-ständig zu X noch Hydroxy, Carboxy, Isothiocyanato oder Halogen tragen kann.

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der Formel (I), worin X für eine Einfachbindung oder für Methylen steht.

25 Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der Formel (I), worin

M für ein Mono- oder für ein Dipeptid steht, das über die α -Aminogruppe und/oder über Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit den n gleichen oder voneinander verschiedenen Gruppierungen

30



35 verknüpft ist, wobei weitere funktionelle Gruppen des Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können.

Bevorzugt bestehen die Peptide M aus Aminosäureresten, die sich ableiten von Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Histidin, Lysin, Ornithin, Serin, Tyrosin, Valin, Diaminopropionsäure, α , γ -Diaminobuttersäure oder Phenylalanin, wobei mehrere Aminosäurereste sowohl über die α -Aminogruppe als auch gegebenenfalls über die Seitenketten-Aminofunktionen oder auch über beide Funktionen peptidisch verknüpft sein können.

40 Falls M weitere funktionelle Gruppen trägt, so sind diese bevorzugt deblockiert.

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der Formel (I), worin C für einen Batracylin-, Methotrexat-, Chinolon-a-, Etoposid-, Melphalan-, Taxol-, Camptothecin-Rest, ein im A-Ring oder B-Ring modifiziertes Camptothecin-Derivat, einen Daunomycin- oder Doxorubicin-Rest steht, wobei C über eine Amino- oder Hydroxyfunktion mit M verknüpft ist.

45 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in stereoisomeren Formen, beispielsweise als Enantiomere oder Diastereomere, oder als deren Gemische, beispielsweise als Racemat, vorliegen. Die Erfindung betrifft sowohl die reinen Stereoisomere als auch deren Gemische.

Die Stereoisomergemische können, falls erforderlich, in bekannter Weise in die stereoisomer einheitlichen Bestandteile getrennt werden, beispielsweise durch Chromatographie oder durch Kristallisationsverfahren.

Die Aminosäurereste können jeweils in der D-Form oder in der L-Form vorliegen.

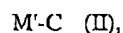
50 Die Nomenklatur der Aminosäuren folgt den von der IUPAC aufgestellten Regeln. Bei fehlender Angabe der Stereochemie wurden Aminosäuren der L-Form eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Form ihrer Salze vorliegen. Im allgemeinen seien hier Salze mit organischen oder anorganischen Basen oder Säuren sowie innere Salze genannt.

55 Zu den Säuren, die addiert werden können, gehören vorzugsweise Halogenwasserstoffsäuren, wie z. B. die Chlorwasserstoffsäure und die Bromwasserstoffsäure, insbesondere die Chlorwasserstoffsäure, ferner Phosphorsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, mono- und bifunktionelle Carbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren, wie z. B. Essigsäure, Trifluoressigsäure, Maleinsäure, Malonsäure, Oxalsäure, Gluconsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Salizylsäure, Sorbinsäure und Milchsäure sowie Sulfonsäuren, wie z. B. p-Toluolsulfonsäure, 1,5-Naphthalin-disulfonsäure oder Camphersulfonsäure.

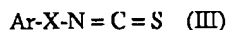
60 Physiologisch unbedenkliche Salze können ebenso Metall- oder Ammoniumsalze solcher erfindungsgemäßen Verbindungen sein, die eine freie Carboxylgruppe besitzen. Besonders bevorzugt sind z. B. Natrium-, Kalium-, Magnesium- oder Calciumsalze, sowie Ammoniumsalze, die abgeleitet sind von Ammoniak oder organischen Aminen wie beispielsweise Ethylamin, Di- bzw. Triethylamin, Di- bzw. Triethanolamin, Dicyclohexylamin, Dimethylaminoethanol, Arginin, Lysin, Ethylendiamin oder Phenethylamin.

65 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

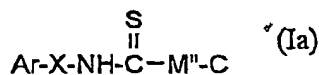


DE 196 40 970 A 1

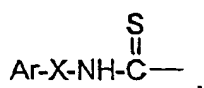
worin C die oben angegebene Bedeutung hat und M' für einen Rest M steht, der an den gewünschten Verknüpfungsstellen Wasserstoffatome trägt und dessen übrige potentielle Verknüpfungsstellen durch Schutzgruppen blockiert sind, mit Verbindungen der allgemeinen Formel (III)



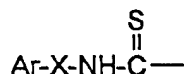
in geeigneten Lösemitteln in Gegenwart einer Base zu Verbindungen der allgemeinen Formel (Ia)



umsetzt, worin Ar, X und C die oben angegebenen Bedeutungen haben und M'' für einen Rest M steht, dessen weitere potentielle Verknüpfungsstellen durch Schutzgruppen blockiert sind, und im Fall der Einführung weiterer Gruppen



die sich von der bzw. den zunächst eingeführten unterscheiden, die entsprechenden Schutzgruppen gegebenenfalls selektiv von den Verbindungen der Formel (Ia) absplattet, diese in der oben angegebenen Weise mit weiteren Verbindungen der allgemeinen Formel (III), die sich von den zunächst eingeführten unterscheiden, umsetzt und gegebenenfalls diese Reaktionssequenz zu Einführung weiterer von den eingeführten Resten verschiedener Reste



wiederholt, und daß man verbleibende Schutzgruppen gegebenenfalls absplattet.

Die erfindungsgemäßen Konjugate können beispielsweise hergestellt werden durch Verknüpfung von Hydroxy- oder Aminogruppen tragenden Cytostatika-Derivaten (z. B. Batracylin, Chinolone oder Camptothecine) mit aktivierten Carboxylkomponenten, die ihrerseits Teile von geschützten Aminosäuren, Peptiden oder N-thiocarbonyl-modifizierten Peptiden darstellen können.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (II) sind zugänglich, indem man nach üblichen Methoden der Peptidchemie gegebenenfalls geschützte Aminosäurebausteine an Amino- oder Hydroxyfunktionen von C anknüpft und gegebenenfalls durch schrittweise Einführung weiterer Aminosäurebausteine eine Peptidkette aufbaut. Alternativ können auch gegebenenfalls Schutzgruppen tragende Peptid-Bausteine nach üblichen Methoden mit C verknüpft werden.

Die Reaktionen können bei verschiedenen Druck- und Temperaturverhältnissen, beispielsweise 0,5 bis 2 bar, bzw. -30 bis +100°C, in geeigneten Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan, Chloroform, niederen Alkoholen, Acetonitril, Dioxan, Wasser oder in Gemischen der genannten Lösungsmittel durchgeführt werden. In der Regel sind Reaktionen in DMF oder THF/Dichlormethan bei Normaldruck und bei einer Temperatur von 0 bis 60°C, insbesondere bei etwa Raumtemperatur, bevorzugt.

Für die Aktivierung der Carboxylgruppen kommen die in der Peptidchemie bekannten Kupplungsreagenzien wie sie z. B. in Jakubke/Jeschkeit: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verlag Chemie 1982 oder Tetrahedr. Lett. 34, 6705 (1993) beschrieben sind, in Frage. Bevorzugt sind beispielsweise Säurechloride, N-Carbonsäureanhydride oder gemischte Anhydride.

Weiterhin bevorzugt zur Aktivierung der Carboxylgruppen ist die Bildung von Addukten mit Carbodiimiden z. B. N,N'-Diethyl-, N,N'-Diisopropyl-, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid, N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat, oder Carbonylverbindungen wie Carbonyldiimidazol, oder 1,2-Oxazoliumverbindungen wie 2-Ethyl-5-phenyl-1,2-oxazolium-3-sulfat oder 2-tert-Butyl-5-methyl-isoxazolium-perchlorat, oder Acylaminoverbindungen wie 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, oder Propanphosphonsäureanhydrid, oder Isobutylchloroform, oder Benzotriazolyl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat, 1-Hydroxybenzotriazol oder Hydroxysuccinimidester.

Als Basen können beispielsweise Triethylamin, Hünig-Base, Ethyl-diisopropylamin, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin oder andere eingesetzt werden.

Als Schutzgruppen für eventuelle weitere reaktive Funktionen im Cytostatikum-Teil oder für Drittfunktionen der Aminosäuren können die in der Peptidchemie bekannten Schutzgruppen beispielsweise vom Urethan-, Alkyl-, Acyl-, Ester- oder Amid-Typ eingesetzt werden.

Aminoschutzgruppen im Rahmen der Erfindung sind die üblichen in der Peptid-Chemie verwendeten Aminoschutzgruppen.

Hierzu gehören bevorzugt Benzyloxycarbonyl, (Cbz) 3,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 2,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 4-Methoxybenzyloxycarbonyl, 4-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitroben-

DE 196 40 970 A 1

zyloxycarbonyl, 2-Nitro-4,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, tert.-Butoxycarbonyl, (Boc) Allyloxycarbonyl, Vinyloxycarbonyl, 3,4,5-Trimethoxybenzyloxycarbonyl, Phthaloyl, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, 2,2,2-Trichlor-tert-butoxycarbonyl, Menthylloxycarbonyl, 4-Nitrophenoxycarbonyl, Fluorenyl-9-methoxycarbonyl (Fmoc), Formyl, Acetyl, Propionyl, Pivaloyl, 2-Chloracetyl, 2-Bromacetyl, 2,2,2-Trifluoracetyl, 2,2,2-Trichloracetyl, Benzoyl, Benzyl, 4-Chlorbenzoyl, 4-Brombenzoyl, 4-Nitrobenzoyl, Phthalimido, Isovaleroyl oder Benzyloxymethylen, 4-Nitrobenzyl, 2,4-Dinitrobenzyl, 4-Nitrophenyl oder 2-Nitrophenylsulfenyl. Besonders bevorzugte Schutzgruppen sind Fmoc, Boc und Cbz.

Die Abspaltung von Schutzgruppen in den entsprechenden Reaktionsschritten kann zum Beispiel durch Säure- oder Baseneinwirkung, hydrogenolytisch oder auf andere Weise reduktiv erfolgen.

Biologische Testung

1. Wachstumsinhibitionstest zur Bestimmung der cytotoxischen Eigenschaften

- Die humanen Dickdarmtumorzelllinien SW 480 und HT 29 (ATCC-Nr. CCL 228 und HBT-38) sowie die Maus-Melanom-Zelllinie B16F10 wurden in Rouxschalen in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% FCS gezogen. Anschließend wurde trypsinisiert und in RPMI plus 10% FCS zu einer Zellzahl von 50.000 Zellen/ml aufgenommen. 100 µl Zellsuspension/Well wurden in eine 96 Mikrowellplatte gegeben und 1 Tag bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 µl RPMI Medium und 1 µl DMSO mit den Prüfsubstanzen zugesetzt. Das Wachstum wurde nach Tag 3 und Tag 6 überprüft. Dazu wurde zu jedem Mikrowell 40 µl MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolinbromid) mit einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml H₂O zugesetzt. Es wurde 5 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 100 µl i-Propanol/Well zugesetzt. Nach 30 min. Schütteln mit 100 µl H₂O wurde die Extinktion bei 540 nm mit einem Titertek Multiskan MCC/340 (Flow) gemessen.
- Die cytotoxische Wirkung ist in der Tabelle 1 als IC₅₀-Wert jeweils für die SW 480- und HT 29- und B16F10-Zelllinie angegeben:

Tabelle 1

Beispiel	IC ₅₀ / µM SW 480	IC ₅₀ / µM HT 29	IC ₅₀ / µM B16F10
1.2)	25	40	-
1.3)	45	70	-
1.4)	40	40	30
1.5)	250	400	-
1.6)	550	800	-

DE 196 40 970 A 1

Beispiel	IC ₅₀ / μ M SW 480	IC ₅₀ / μ M HT 29	IC ₅₀ / μ M B16F10
2.1)	20	9	9
2.2)	15	6	4
2.3)	0,9	0,7	0,2
2.4)	0,8	0,9	1
2.5)	200	> 200	200
2.6)	0,2	0,3	0,06
2.8)	0,2	0,1	0,1
2.9)	2	2	1
2.10)	2	2	0,4
2.11)	60	150	30
3)	3	2	1
4.1)	0,01	0,02	0,1
4.2)	0,07	0,06	0,3
4.3)	0,02	0,02	0,1
4.4)	0,3	0,2	0,6
4.5)	0,3	0,2	0,8
4.6)	0,2	0,15	0,5
4.7)	0,1	0,06	0,3
4.8)	0,3	0,15	0,8
4.9)	0,02	0,015	0,2
4.10)	0,02	0,01	0,2
4.11)	0,06	0,03	0,2

2. Hämatopoetische Aktivität von Konjugaten im Vergleich zum zugrundeliegenden Wirkstoff

Material und Methoden

Knochenmarkszellen wurden aus dem Femur der Maus gespült. 10⁵-Zellen werden in McCoy 5A-Medium (0,3% Agar) zusammen mit rekombinanten murinen GM-CSF (Genzyme; Stammzellen-Kolonienbildung) und den Substanzen (10⁻⁴ bis 100 μ g/ml) bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. 7 Tage später wurden die Kolonien (<50 Zellen) und Kluster (17-50 Zellen) ausgezählt.

DE 196 40 970 A 1

Ergebnisse

Wie in Tabelle 2 dargestellt zeigen die untersuchten Konjugate eine gegenüber dem zugrundeliegenden Wirkstoff eine drastisch verminderte Hemmung der Knochenmarkstammzellproliferation.

Tabelle 2

Hemmung der CSF-induzierten Proliferation von Knochenmarkstammzellen der Maus

Beispiel	IC ₅₀ [ng/ml]
Chinolon-a	0,2
2.4)	60,0
Camptothecin	0,4
4.4)	10
4.9)	22

3. In-vivo-Hemmung des Tumorwachstums im Nacktmaus-Modell

Material

Für alle in-vivo-Experimente zur Untersuchung der Hemmung des Tumorwachstums wurden athymische Nacktmäuse (NMRJ nu/nu-Stamm) verwendet. Das ausgewählte großzellige Lungenkarzinom LXFL 529 wurde durch serielle Passage in Nacktmäusen entwickelt. Der menschliche Ursprung des Tumors wurde durch isoenzymatische und immunohistochemische Methoden belegt.

Experimenteller Aufbau

Der Tumor wurde subcutan in beide Flanken von 6 bis 8 Wochen alten nu/nu-Nacktmäusen implantiert. Die Behandlung wurde, abhängig von der Verdopplungszeit, gestartet sobald die Tumoren einen Durchmesser von 5-7 mm erreicht hatten. Die Mäuse wurden der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (5 Mäuse pro Gruppe mit 8-10 auswertbaren Tumoren) durch Randomisieren zugeteilt. Die einzelnen Tumoren der Kontrollgruppe wuchsen alle progressiv.

Die Größe der Tumoren wurde in zwei Dimensionen mittels Schieblehre vermessen. Das Tumolvolumen, das gut mit der Zellzahl korreliert, wurde anschließend für alle Auswertungen verwendet. Das Volumen wurde gemäß der Formel "Länge x Breite x Breite/2" berechnet ($(a \times b^2)/2$, a bzw. b stehen für zwei rechtwinklig angeordnete Durchmesser).

Die Werte des relativen Tumolvolumens (RTV) wurden für jeden einzelnen Tumor durch Dividieren der Tumorgröße am Tag X mit der Tumorgröße des Tages 0 (zum Zeitpunkt der Randomisierung) berechnet. Die mittleren Werte des RTV wurden dann für die weitere Auswertung verwendet.

Die Hemmung der Zunahme des Tumolvolumens (Tumolvolumen der Testgruppe/Kontrollgruppe, T/C, in Prozent) war der abschließende Meßwert.

Behandlung

Die Applikation der Verbindungen erfolgte an Tag 1, 2 und 3 nach Randomisierung intraperitoneal (i.p.).

Ergebnisse

Anhand der Verbindung aus Beispiel 4.4) ist die therapeutische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate gegenüber dem großzelligen humanen Lungentumorenografts LXFL 529 dargestellt. Die Therapie führt bei der maximal tolerablen Dosis (MTD) und bei der Hälfte der MTD zu Tumorremissionen.

DE 196 40 970 A 1

Tabelle 3

Therapie	Dosis [mg/kg/Tag]	Überlebens- zeit [Tage]	Zahl der Tumore [Tag 21]	relatives Tumolvolumen an Tag 21 [% des Tags 0]	relatives Körpergewicht an Tag 21 [% des Tags 0]
Kontroll- gruppe	-	>39 35 35 >18 >35	16	1137	111,6
Beispiel 4.4)	6,25 (MTD)	7 >43 >43 >43 >43	9	0,2	113,0
Beispiel 4.4)	3,125	>43 >43 >43 >43	7	69,5	105,8

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen sowohl in-vitro als auch in-vivo eine überraschen starke cytotoxische Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumoren, insbesondere solchen der Lunge und des Dickdarms, verbunden mit einer großen Selektivität gegenüber nicht malignen Zellen auf.

Sie eignen sich daher zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere von solchen der Lunge und des Dickdarms.

Zur vorliegenden Erfindung gehören pharmazeutische Zubereitungen, die neben nicht-toxischen, inerten pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen eine oder mehrere erfindungsgemäße Verbindungen enthalten oder die aus einem oder mehreren erfindungsgemäßen Wirkstoffen bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitungen.

Der oder die Wirkstoffe können gegebenenfalls in einem oder mehreren der oben angegebenen Trägerstoffe auch in mikroverkapselter Form vorliegen.

Die therapeutisch wirksamen Verbindungen sollen in den oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 99,5, vorzugsweise von etwa 0,5 bis 95 Gew.-%, der Gesamtmischung vorhanden sein.

Die oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können außer den erfindungsgemäßen Verbindungen auch weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

Im allgemeinen hat es sich sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als vorteilhaft erwiesen, den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe in Gesamtmengen von etwa 0,5 bis etwa 500, vorzugsweise 5 bis 100 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben, zur Erzielung der gewünschten Ergebnisse zu verabreichen. Eine Einzelgabe enthält den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe vorzugsweise in Mengen von etwa 1 bis etwa 80, insbesondere 3 bis 30 mg/kg Körpergewicht.

Synthesebeispiele

Alle Thiocarbonyl-Aminosäure- bzw. Thiocarbonyl-Peptidkonjugate, die Gegenstand dieser Erfindung sind, werden nach der folgenden allgemeinen Vorschrift synthetisiert:

Eine Lösung von 1 mmol des zugrundeliegenden Aminosäure- bzw. Peptidkonjugats in 50 ml absolutem Dimethylformamid wird mit je 1,1 mmol des entsprechenden Isothiocyanats pro freier Aminogruppe versetzt. Nach Zugabe von 1,74 ml (10 mmol) Ethyldiisopropylamin wird der Ansatz bei Raumtemperatur gerührt bis sich im Dünnschichtchromatogramm kein Aminosäure- bzw. Peptidkonjugat mehr nachweisen läßt, längstens jedoch 16 h. Man engt i. Vak. ein und reinigt den Rückstand nach Trocknung i. Hochvak. durch Flash-Chromatographie an Kieselgel z. B. mit einem Ethylacetat/Petrolether- oder einem Dichlormethan/Methanol-System. Auch mehrmaliges Umfällen aus Dichlormethan/Methanol 1 : 1 (v/v) mit Diethylether ergibt vielfach reine Produkte.

Verbleibende Schutzgruppen werden anschließend in einer zweiten Stufe nach literaturbekannten Verfahren entfernt (eine Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-Gruppe z. B. mit Piperidin in absolutem Dimethylformamid bei Raumtemperatur; eine tert-Butoxycarbonyl-Gruppe z. B. mit Trifluoressigsäure in absolutem Dichlormethan bei Raumtemperatur).

Die entsprechenden Isothiocyanate sind im Chemikalienfachhandel zu erwerben oder werden nach literaturbekannten Methoden synthetisiert.

DE 196 40 970 A 1

Vorstufen: Aminosäure- bzw. Peptidkonjugate

Beispiel 1.1

N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-batracyclin, Trifluoressigsäure

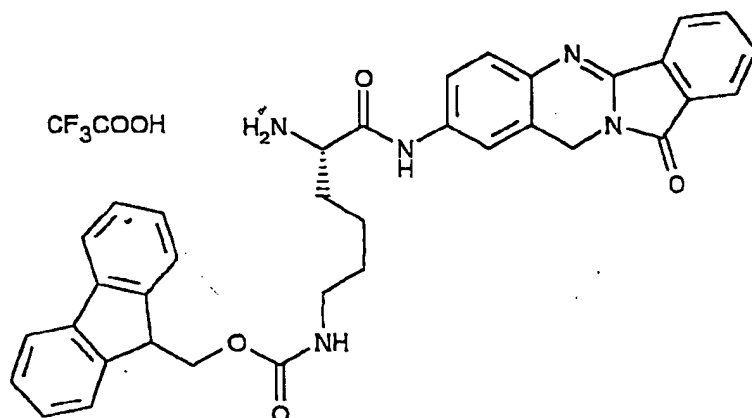
5

10

15

20

25

I.1.a) N-[N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-batracyclin

N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysin (5,3 g, 11,3 mmol) und 2-Isobutoxy-1-isobutoxy-
 ycarbonyl-1,2-dihydro-chinolin (4 ml, 14 mmol) werden in 40 ml Dichlormethan gelöst. Nach 20 min. Rühren bei
 Raumtemperatur setzt man eine Lösung von Batracyclin (2,5 g, 10 mmol) in Dimethylformamid (80 ml) zu und rührt den
 Ansatz für weitere 24 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird im Vakuum eingedunstet bis Kristallisation einsetzt. Die
 erhaltene Suspension wird mit Ethanol (500 ml) versetzt und für 1 h unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlung auf
 Raumtemperatur wird das Produkt abfiltriert und mit Aceton und dann mit Diethylether gewaschen. Man erhält gelbe
 Kristalle (5,9 g, 84%) [DC (Ethylacetat): R_f = 0,57; Schmp. = 158°C (Zers.)].

35

I.1) N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-batracyclin, Trifluoressigsäure

Eine Suspension der obigen Verbindung (5,6 g, 8 mmol) in Dichlormethan (75 ml) wird mit wasserfreier Trifluores-
 sigsäure (25 ml) versetzt und die resultierende Lösung für 90 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Va-
 kuum wird der Rückstand durch Zugabe von Diethylether (200 ml) kristallisiert. Der Niederschlag wird abfiltriert und in-
 tensiv mit Diethylether gewaschen. Nach mehrmaligem Umfällen aus Dichlormethan/Methanol 1 : 1 mit Diethylether
 erhält man gelb-orange Kristalle (5,13 g, 90%) [DC (Ethylacetat): R_f = 0,05; Schmp. = 162°C (Zers.)].

40

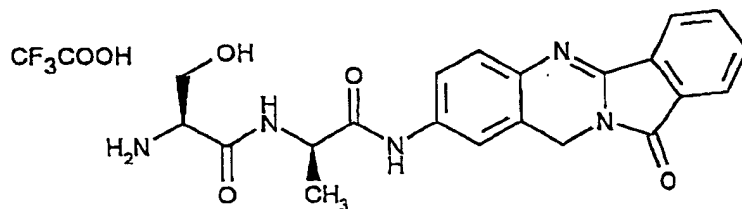
Beispiel 1.2

45

N-[Seryl-D-alanyl]-batracyclin, Trifluoressigsäure

50

55



1.2.a) N-[N-Benzoyloxycarbonyl-D-alanyl]-batracyclin

60

N-Benzoyloxycarbonyl-D-alanin (3,9 g, 17,5 mmol) wird in Analogie zu Beispiel 1.1.a mit Batracyclin (4,1 g,
 16,4 mmol) umgesetzt. Nach Einengen im Vakuum auf 50 ml wird mit Ethylacetat auf 300 ml aufgefüllt und sofort für
 10 min. zum Sieden erhitzt. Anschließend läßt man auf Raumtemperatur abkühlen, filtriert ab und kocht das Filtergut er-
 neut mit Ethylacetat (200 ml) aus. Abkühlung unter Rühren auf 0°C und Filtration ergibt gelbe Kristalle. Die Kristalle
 (6,4 g, 80%) werden durch Filtration abgetrennt und die vereinigten Filtrate nach Einengen im Vakuum durch Flashchro-
 matographie [Petrolether/Ethylacetat 3 : 2 → 1 : 1] gereinigt. Man erhält weitere 1,35 g (17%) [DC (Ethylacetat): R_f =
 0,45; Schmp. = 256 °C; [α]_D²⁰ = +75,1° (c = 1,0/CH₂Cl₂ + 0,5% CH₃OH)].

65

DE 196 40 970 A 1

I.2.b) N-[D-Alanyl]-batracylin

Verbindung I.2.a (11,4 g, 25 mmol) wird in einer 33%-igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig (100 ml) gelöst. Nach 30 min. bei Raumtemperatur wird der Ansatz im Vakuum auf 30 ml eingeeengt und anschließend unter kräftigem Rühren in gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1000 ml) gegossen. Man rührt für 10 min. weiter, filtriert ab und wäscht mit Wasser, wenig Isopropanol und Diethylether. Das Produkt fällt in gelben Kristallen (7,87 g, 98%) an [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,06$; Schmp. = 267°C (Zers.)].

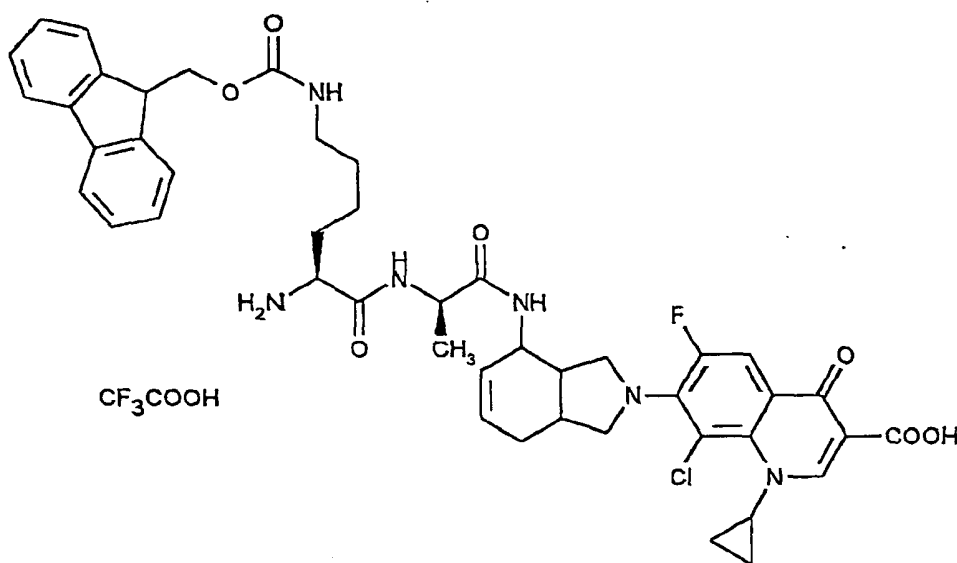
I.2.c) N-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-seryl-D-alanyl]-batracylin

Darstellung in Analogie zu Beispiel I.1.a aus N-(tert-Butoxycarbonyl)-serin und N-[D-Alanyl]-batracylin (Beispiel I.2.b); Ausb.: 77%.

I.2) N-[Seryl-D-alanyl]-batracylin, Trifluoracetat

Darstellung in Analogie zu Beispiel I.1 aus Verbindung I.2.c; Ausb.: 98%.

Beispiel 1.3

N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-chinolon-a, Trifluoracetat

I.3.a) N-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-D-alanyl]-chinolon-a

N-(tert-Butoxycarbonyl)-D-alanin (3,6 g, 19,2 mmol) und 2-Isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydro-chinolin (5,8 g, 19,2 mmol) werden in 200 ml Dimethylformamid gelöst. Nach 8 h Rühren bei Raumtemperatur setzt man Chinolon-a (4 g, 9,6 mmol) und Ethyldiisopropylamin (3,3 ml) zu und behandelt den Ansatz 10 h mit Ultraschall. Man engt ein, nimmt den Rückstand in Dichlormethan auf und fällt mit Ether. Nach Filtration, Waschen mit Ether und Trocknen im Hochvakuum erhält man 4,58 g (81%) vom Zielprodukt, welches ohne weitere Reinigung umgesetzt wird.

I.3.b) N-[D-Alanyl]-chinolon-a, Trifluoracetat

4,56 g (7,75 mmol) der Verbindung aus obigem Beispiel werden in einer Mischung aus Dichlormethan (50 ml) und wasserfreier Trifluoressigsäure (50 ml) bei 0°C gelöst und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Man engt ein, destilliert mit Dichlormethan nach und fällt den Rückstand aus Methanol mit Diethylether um. Man erhält 4,07 g (87%) des kristallinen Zielproduktes [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): $R_f = 0,34$].

I.3.c) N-[N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-chinolon-a

N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysin (1,57 g, 3,36 mmol) wird in Dimethylformamid (25 ml) gelöst und bei 0°C mit N-Hydroxysuccinimid (600 mg, 5,04 mmol) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (820 mg, 4,03 mmol) versetzt. Nach 3 h filtriert man den entstandenen Harnstoff ab, gibt zum Filtrat 1,5 g (2,86 mmol) der Verbindung aus Beispiel I.3.b) und rührt 16 h bei Raumtemperatur. Restlicher Harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat durch Flash-Chromatographie [Dichlormethan/Methanol 97,5 : 2,5 → 90 : 10] gereinigt. Anschließend fällt man aus

DE 196 40 970 A 1

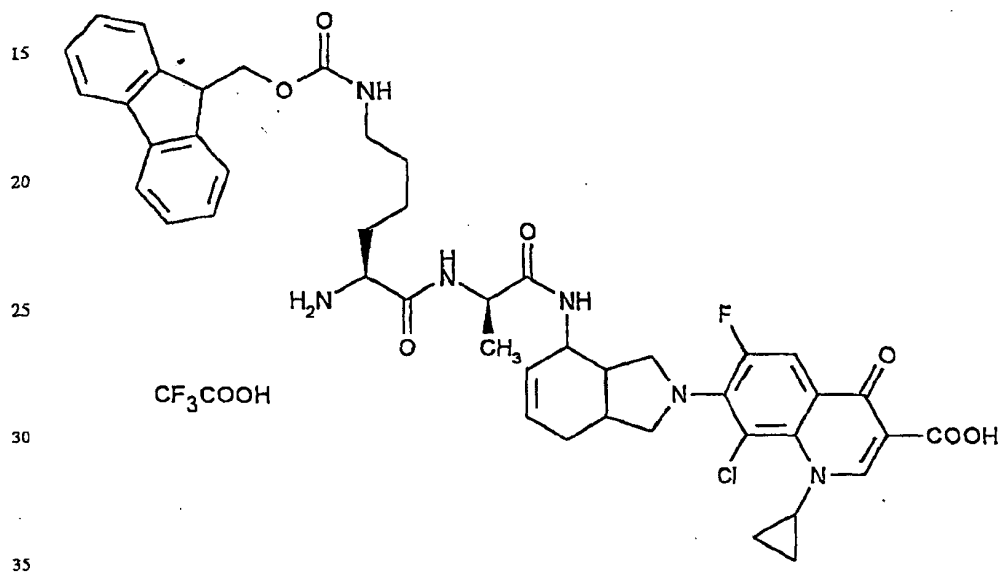
Dichlormethan/Methanol 1 : 1 mit Diethylether uml. Ausb.: 1,5 g (56%) [DC(Dichlormethan/Methanol 9 : 1): $R_f = 0,47$].

I.3) N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]chinolon-a, Trifluoracetat

5 Abspaltung der tert-Butoxycarbonyl-Gruppe aus Verbindung I.3.c in Analogie zu Beispiel I.1 und Umfällung des Rohproduktes aus Methanol mit Diethylether ergibt gelbe Kristalle. Ausb.: 80% [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak (17%ig) 15 : 4 : 0,5): $R_f = 0,36$].

Beispiel I.4

10 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin, Trifluoracetat



I.4.a) 20-O-(Alanyl)-camptothecin, Trifluoracetat

40 Camptothecin (500 mg, 1,44 mmol) werden in absolutem Dimethylformamid (20 ml) gelöst und dann mit 4-Dimethylaminopyridin (50 mg) und N-tert-Butoxycarbonyl-alanin-N-carboxy-anhydrid (775 mg, 3,6 mmol) versetzt. Nach 3 h werden weitere 775 mg (3,6 mmol) N-tert-Butoxycarbonyl-alanin-N-carboxyanhydrid zugegeben und die Suspension 16 h mit Ultraschall behandelt. Man engt ein, nimmt das Rohmaterial in Dichlormethan (50 ml) auf und gibt bei 0°C 5 ml Trifluoressigsäure zu. Nach 30 min. Rühren wird erneut eingengt und das Produkt durch Flash-Chromatographie gereinigt (Acetonitril/Wasser 20 : 1). Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt, eingengt und nach Lösen in Di-

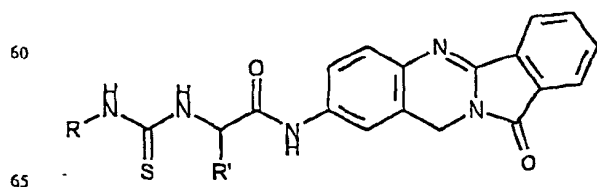
45 oxan/Wasser lyophilisiert. Man erhält 712 mg (93%) der Zielverbindung [FAB-MS: $m/z = 420$ ($M+H^+$)].

I.4) 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]camptothecin, Trifluoracetat

50 Das Konjugat aus Beispiel I.4.a wird nach Standard-Vorschrift (siehe Beispiel I.1.a) mit N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysin verknüpft und anschließend in Analogie zu Beispiel 1.1 an der α-Aminofunktion deblockiert. Man erhält die Zielverbindung in einer Ausbeute von 24% [DC (Acetonitril/Wasser 20 : 1): $R_f = 0,15$].

Beispiele I.1-1.3

55 Konjugate des Batracylins mit einer Aminosäure; allgemeine Formel



DE 196 40 970 A 1

1.1) N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-D-alanyl]batracyclin

Edukt: N-(D-alanyl)-batracyclin
 Ausb.: 76% [DC (Ethylacetat/Eisessig 100 : 1): $R_f = 0,53$; Schmp.: 185°C]

5

1.2) N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]-batracyclin

Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-batracyclin, Trifluoracetat
 Ausb.: 68% über 2 Stufen [DC (Dichlormethan/Methanol 5 : 1): $R_f = 0,31$; Schmp.: 162°C (Zers.)]

10

1.3) N-[N^ε-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]-batracyclin

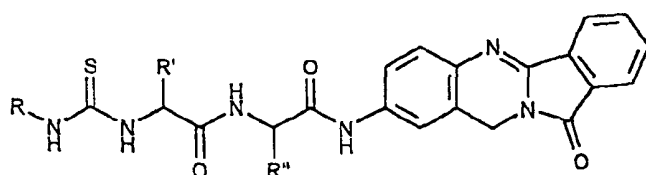
Edukt: N-[N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-lysyl]-batracyclin
 Ausb.: 71% über 2 Stufen [DC (Dichlormethan/Methanol 5 : 1): $R_f = 0,30$; Schmp.: 162°C (Zers.)]

15

Beispiele 1.4-1.8

Konjugate des Batracyclins mit zwei Aminosäuren; allgemeine Formel

20



25

1.4) N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-D-alanyl]batracyclin

30

Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-batracyclin, Trifluoracetat,
 Ausb.: 70% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): $R_f = 0,36$]

1.5) N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-seryl-D-alanyl]batracyclin

35

Edukt: N-(Seryl-D-alanyl)-batracyclin, Trifluoracetat
 Ausb.: 45% [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15 : 2 : 0,2): $R_f = 0,32$]

1.6) N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-glutamyl-D-alanyl]batracyclin

40

Edukt: N-(Glutamyl-D-alanyl)-batracyclin
 Ausb.: 70% [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15 : 8 : 0,8): $R_f = 0,68$]

1.7) N-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysylseryl]-batracyclin

45

Edukt: N-(Lysyl-seryl)-batracyclin, Di-Trifluoracetat
 Ausb.: 46% [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15 : 3 : 0,2): $R_f = 0,24$; Schmp.: 155-157°C (Zers.)]

1.8) N-[N^α-[N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]α,β-diaminopropionyl]-batracyclin

50

Edukt: N-[N^α-Lysyl-N^β-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-α,β-diaminopropionyl]-batracyclin, Di-Trifluoracetat
 Ausb.: 39% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): $R_f = 0,54$]

55

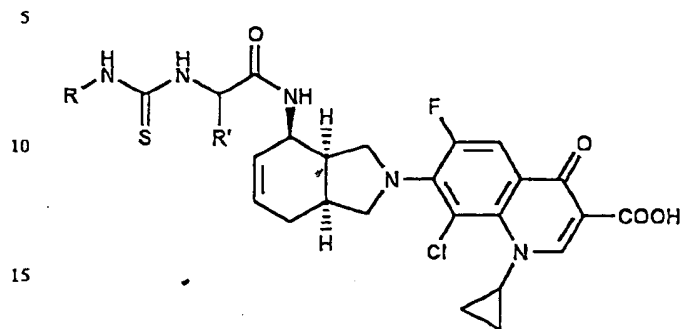
60

65

DE 196 40 970 A 1

Beispiele 2.1-2.10

Konjugate des Chinolons-a mit einer Aminosäure; allgemeine Formel



2.1) N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-alanyl]chinolon-a

Edukt: N-(Alanyl)-chinolon-a, Trifluoracetat
 Ausb.: 48% [DC (Acetonitril/Wasser 10 : 1): $R_f = 0,55$]

2.2) N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-D-alanyl]chinolon-a

Edukt: N-(D-Alanyl)-chinolon-a, Trifluoracetat
 Ausb.: 61% [DC (Dichlormethan/Methanol/Eisessig 90 : 10 : 1): $R_f = 0,38$]

2.3) N-[N $^{\alpha}$ -(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)- α,γ -diaminobutyryl]chinolon-a, Hydrochlorid

Edukt: N-[N $^{\gamma}$ -(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)- α,γ -diaminobutyryl]chinolon-a, Trifluoracetat
 salzfreie Vorstufe: 60% über 2 Stufen [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%-ig 10 : 10 : 3): $R_f = 0,51$; Schmp.: 221°C (Zers.)]
 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Wasser suspendiert und der pH-Wert mit 0,1 N Salzsäure auf 2-3 eingestellt. Nach Filtration wird das Filtrat lyophilisiert.

2.4) N-[N $^{\alpha}$ -(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]chinolon-a, Hydrochlorid

Edukt: N-[N $^{\epsilon}$ -(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]chinolon-a, Trifluoracetat
 Ausb.: 74% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): $R_f = 0,33$]

2.5) N-[N $^{\alpha},N^{\epsilon}$ -bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-D-lysyl]chinolon-a

Edukt: N-(D-Lysyl)-chinolon-a, Di-Trifluoracetat
 Ausb.: 59% [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): $R_f = 0,33$; Schmp.: 186°C]

2.6) N-[N $^{\alpha}$ -(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-ornithyl]chinolon-a, Hydrochlorid

Edukt: N-[N $^{\delta}$ -(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-ornithyl]chinolon-a, Trifluoracetat
 salzfreie Vorstufe: 47% über 2 Stufen [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%-ig 10 : 10 : 3): $R_f = 0,36$; Schmp.: 211°C (Zers.)]
 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Wasser suspendiert und der pH-Wert mit 0,1 N Salzsäure auf 2-3 eingestellt. Nach Filtration wird das Filtrat lyophilisiert.

2.7) N-[N $^{\alpha}$ -(Phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]chinolon-a

Edukt: N-[N $^{\epsilon}$ -(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]chinolon-a, Trifluoracetat
 Ausb.: 58% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): $R_f = 0,48$]

2.8) N-[N $^{\alpha}$ -(4-Isothiocyanato-phenylamino-thiocarbonyl)-lysylichinolon-a

Edukt: N-[N $^{\epsilon}$ -(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]chinolon-a, Trifluoracetat
 Ausb.: 73% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): $R_f = 0,38$]

2.9) N-[N $^{\alpha}$ -(4-Carboxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]chinolon-a

Edukt: N-[N $^{\epsilon}$ -(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]chinolon-a, Trifluoracetat

DE 196 40 970 A 1

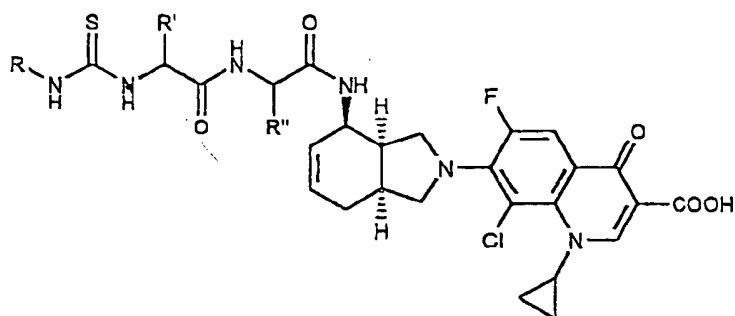
Ausb.: 62% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 10 : 3 : 1,5): $R_f = 0,6$]

2.10) N-[N^α-(Phenyl-methyl-amino-thiocarbonyl)-lysyl]-chinolon-a

Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-chinolon-a, Trifluoracetat
 Ausb.: 59% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): $R_f = 0,44$]

Beispiel 2.11

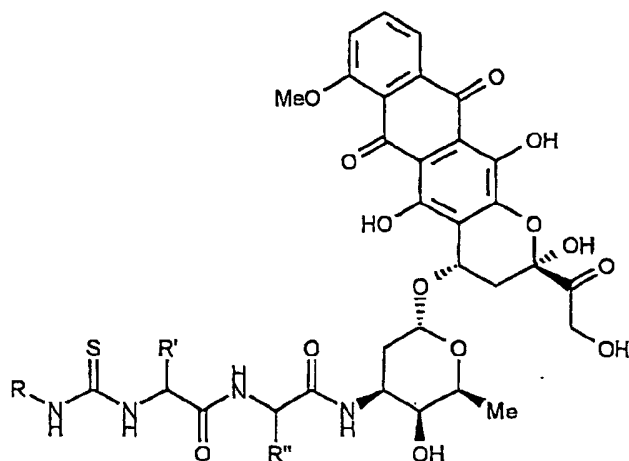
Konjugate des Chinolons-a mit zwei Aminosäuren; allgemeine Formel

2.11) N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-chinolon-a

Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-chinolon-a Trifluoracetat
 Ausb.: 53% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2) $R_f = 0,33$]

Beispiel 3

Konjugate des Doxorubicins; allgemeine Formel

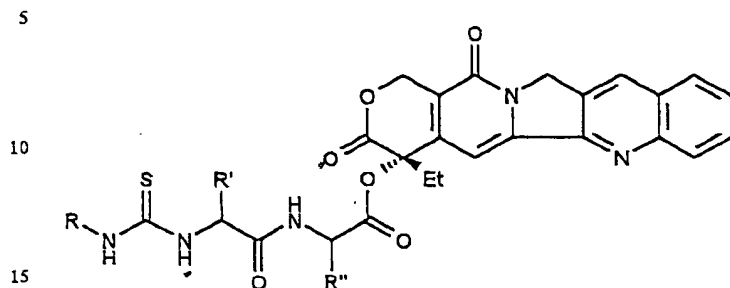
3) N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-alanyl]-doxorubicin

Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-doxorubicin, Trifluoracetat,
 Ausb.: 46% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): $R_f = 0,2$; FAB-MS: $m/z = 894 (M+H)^+$]

DE 196 40 970 A 1

Beispiele 4.1-4.11

Konjugate des Camptothecins; allgemeine Formel

4.1) 20-O-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-alanyl]camptothecin

20 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin, Trifluoracetat
Ausb.: 80% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): R_f = 0,32]

4.2) 20-O-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-leucyl]camptothecin, Hydrochlorid

25 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-leucyl]-camptothecin, Trifluoracetat
salzfreie Vorstufe: 71% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): R_f = 0,48]
Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

30 4.3) 20-O-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysylphenylalanyl]-camptothecin

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-phenylalanyl]camptothecin, Trifluoracetat
Ausb.: 75% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): R_f = 0,33]

35 4.4) 20-O-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]camptothecin, Hydrochlorid

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
salzfreie Vorstufe: 68% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): R_f = 0,35; FAB-MS: m/z = 727 (M+H)⁺]
40 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

4.5) 20-O-[N^α-(4-Carboxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]camptothecin, Hydrochlorid

45 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
salzfreie Vorstufe: 79% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): R_f = 0,46]
Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

50 4.6) 20-O-[N^α-(4-Chlor-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]camptothecin, Hydrochlorid

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
salzfreie Vorstufe: 86% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 10 : 1 : 0,1): R_f = 0,24]
55 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

4.7) 20-O-[N^α-(Phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
60 salzfreie Vorstufe: 67% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): R_f = 0,5]
Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

65 4.8) 20-O-[N^α-(Phenyl-methyl-amino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]camptothecin, Hydrochlorid

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
salzfreie Vorstufe: 55% über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5 : 1 : 0,2): R_f = 0,5]
Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

DE 196 40 970 A 1

chlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

4.9) 20-O-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysylalanyl]-camptothecin

Edukt: 20-O-(Lysyl-alanyl)-camptothecin, Di-Trifluoracetat
Ausb.: 64% [DC (Acetonitril/Wasser 10 : 1): R_f = 0,72]

5

4.10) 20-O-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-camptothecin

Edukt: 20-O-(Lysyl-D-alanyl)-camptothecin, Di-Trifluoracetat
Ausb.: 77% [DC (Acetonitril/Wasser 20 : 1): R_f = 0,40; FAB-MS: m/z = 850 (M+H)⁺]

10

4.11) 20-O-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysylphenylalanyl]-camptothecin

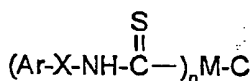
Edukt: 20-O-(Lysyl-phenylalanyl)-camptothecin, Di-Trifluoracetat
Ausb.: 84% [DC (Acetonitril/Wasser 20 : 1): R_f = 0,6]

15

Patentansprüche

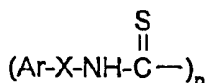
1. Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

20



25

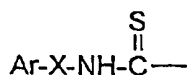
worin



30

für 1 bis n' gleiche oder voneinander verschiedene Gruppierungen

35



40

steht, wobei n eine Zahl 1 bis n' bedeutet und n' der maximalen Zahl möglicher Anknüpfungsstellen von M entspricht, worin

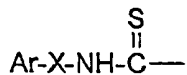
Ar für einen Arylrest mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen steht, der zusätzlich zu X gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert sein kann durch Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Alkoxy-carbonyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Carboxy, Carboxylalkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Cyano, Nitro, Isocyanato, Isothiocyanato, Halogen, Sulfonyl und/oder Sulfonamid,

45

X für eine direkte Einfachbindung oder für Alkylen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen steht,

M für ein Mono-, Di-, Tri- oder Tetrapeptid steht, das über die α-Aminogruppe und/oder über Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit den n gleichen oder voneinander verschiedenen Gruppierungen

50



55

verknüpft ist, wobei weitere funktionelle Gruppen des Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können, und C für einen Rest eines Cytostatikums oder eines Cytostatikum-Derivats steht, das über eine Aminofunktion oder über ein Sauerstoffatom mit M verknüpft ist,

sowie deren Stereoisomere, Stereoisomerengemische und Salze.

60

2. Verbindungen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

Ar für einen Phenylrest steht, der para-ständig zu X noch Hydroxy, Carboxy, Isothiocyanato oder Halogen tragen kann,

sowie deren Stereoisomeren, Stereoisomerengemische und Salze.

3. Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß

65

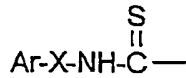
X für eine Einfachbindung oder für Methylen steht,

sowie deren Stereoisomeren, Stereoisomerengemische und Salze.

4. Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß

DE 196 40 970 A 1

M für ein Mono- oder für ein Dipeptid steht, das über die α -Aminogruppe und/oder Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit den 1 bis n gleichen oder voneinander verschiedenen Gruppierungen



verknüpft ist, wobei weitere funktionelle Gruppen des Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können, sowie deren Stereoisomeren, Stereoisomerengemische und Salze.

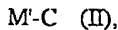
5. Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide M aus Aminosäureresten bestehen, die sich ableiten von Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Histidin, Lysin, Ornithin, Serin, Tyrosin, Valin oder Diaminopropionsäure, wobei mehrere Aminosäurereste sowohl über die α -Aminogruppe als auch gegebenenfalls über die Seitenketten-Aminofunktionen und auch über beide Funktionen peptidisch verknüpft sein können,

sowie deren Stereoisomere, Stereoisomerengemische und Salze.

6. Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß C für einen Batracylin-, Methotrexat-, Chinolon-a-, Etoposid-, Melphalan-, Taxol-, Camptothecin-Rest, ein im A-Ring oder B-Ring modifiziertes Camptothecin-Derivat, einen Daunomycin- oder Doxorubicin-Rest steht, wobei C über eine Amino- oder Hydroxyfunktion mit M verknüpft ist,

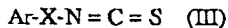
sowie deren Stereoisomere, Stereoisomerengemische und Salze.

7. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

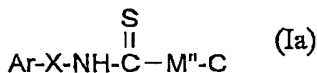


worin C die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat und M' für einen in Anspruch 1 definierten Rest M steht, der an den gewünschten Verknüpfungsstellen Wasserstoffatome trägt und dessen übrige potentielle Verknüpfungsstellen durch Schutzgruppen blockiert sind,

mit Verbindungen der allgemeinen Formel (III)

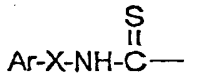


in geeigneten Lösemitteln in Gegenwart einer Base zu Verbindungen der allgemeinen Formel (Ia)

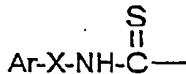


umsetzt,

worin Ar, X und C die oben angegebenen Bedeutungen haben und M" für einen Rest M steht, dessen weitere potentielle Verknüpfungsstellen durch Schutzgruppen blockiert sind, und im Fall der Einführung weiterer Gruppen



die sich von der bzw. den zunächst eingeführten unterscheiden, die entsprechenden Schutzgruppen gegebenenfalls selektiv von den Verbindungen der Formel (Ia) abspaltet, diese in der oben angegebenen Weise mit weiteren Verbindungen der allgemeinen Formel (III), die sich von den zunächst eingeführten unterscheiden, umsetzt und gegebenenfalls diese Reaktionssequenz zu Einführung weiterer von den eingeführten Resten verschiedener Reste



wiederholt,

und daß man verbleibende Schutzgruppen gegebenenfalls abspaltet,

daß man weiterhin gegebenenfalls nach üblichen Methoden die Stereoisomeren trennt und daß man gegebenenfalls die Verbindungen in ihre Salze überführt.

8. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln.

9. Arzneimittel enthaltend Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1.